

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
4. Juli 2002 (04.07.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/052028 A1

(51) Internationale Patentklassifikation: C12P 19/04,  
C12R 1/02, C08L 1/02

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/13123

(22) Internationales Anmeldedatum:  
13. November 2001 (13.11.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 64 314.0 22. Dezember 2000 (22.12.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): DEGUSSA BIOACTIVES DEUTSCHLAND  
GMBH & CO. KG [DE/DE]; Lise-Meitner-Strasse 34,  
85354 Freising (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BÖKENKAMP,  
Dirk [DE/DE]; Am Bellingholz 18, 59368 Werne (DE).  
HOPPE, Hans-Ullrich [DE/DE]; Meisenstrasse 14,  
85416 Langenbach (DE). HEMPEL, Jan, Carsten  
[DE/DE]; Thalhauser Strasse 21, 85354 Freising (DE).

(74) Anwälte: FÜCHSLE, Klaus usw.; Hoffmann . Eitle, Ara-  
bellastrasse 4, 81925 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,  
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,  
MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen
- insgesamt in elektronischer Form (mit Ausnahme des Kopf-  
bogens); auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: MICROBIALY PRODUCED, PHYSIOLOGICALLY COMPATIBLE, PERMEABLE FILM COMPRISED OF CEL-  
LULOSE THAT CONTAINS CHITOSAN

(54) Bezeichnung: MIKROBIELL ERZEUGTER, PHYSIOLOGISCH-VERTRÄGLICHER, PERMEABLER FILM,  
BESTEHEND AUS CHITOSAN-ENTHALTENDER CELLULOSE

(57) Abstract: The invention relates to a microbially produced, physiologically compatible, permeable film comprised of cellulose that contains chitosan. Said film is, in essence, made with the aid of a microorganism that produces both cellulose and chitosan, and the film contains at least 0.1 wt. % chitosan. In order to produce this equally gas-permeable and/or liquid-permeable and/or transparent film, which is to be used, in particular, as a wound dressing and/or as a skin substitute and/or as an artificial blood vessel, first and foremost, recombinant bacterial cells of the strain *Acetobacter xylinum* are used, in which a gene that codes for chitin synthetase has been transformed with the aid of a plasmid and/or vector. The gene itself should come from a yeast such as e.g. *Aspergillus nidulans* or *Neurospora crassa*. The utilized host microorganisms can, however, also be additionally suited for the synthesis of biopolymers that are structurally related to chitin.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein mikrobiell erzeugter, physiologisch-verträglicher, permeabler Film, bestehend aus Chitosan-enthaltender Cellulose, der im Wesentlichen mit Hilfe eines cellulose- und chitinproduzierenden Mikroorganismus hergestellt wurde und der mindestens 0,1 Gew.-% Chitosan enthält. Für die Herstellung dieses gleichermaßen gas- und/oder flüssigkeits- und/oder lichtdurchlässigen Filmes, der insbesondere als Wundauflage und/oder Hautersatz und/oder als künstliche Blutbahn eingesetzt wird, werden vor allem rekombinante Bakterienzellen des Stammes *Acetobacter xylinum* eingesetzt, in die ein für Chitin-Synthetase codierendes Gen mit Hilfe eines Plasmids und/oder Vectors transformiert worden ist. Das Gen selbst sollte aus einem Hefepilz, wie z. B. *Aspergillus nidulans* oder *Neurospora crassa*, stammen. Die eingesetzten Wirtsmikroorganismen können aber auch zusätzlich zur Synthese von mit Chitin strukturell verwandten Biopolymeren geeignet sein.

WO 02/052028 A1

**Mikrobiell erzeugter, physiologisch-verträglicher, permeabler  
Film, bestehend aus Chitosan-enthaltender Cellulose**

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein mikrobiell  
5 erzeugter, physiologisch-verträglicher, permeabler Film,  
bestehend aus Chitosan-enthaltender Cellulose.

Bei der Cellulose handelt es sich um ein vorwiegend im  
Pflanzenreich weit verbreitetes und dort meist mit anderen  
10 Gerüstsubstanzen (Lignin) vergesellschaftetes Polysaccharid  
aus  $\beta$ -1,4-glycosidisch verknüpften Glucosemolekülen. Auch  
Mikroorganismen sind in der Lage, Cellulose zu  
synthetisieren. Native Cellulose besteht aus ca. 8 000 bis  
12 000 Glucoseeinheiten, entsprechend einer relativen  
15 Molekülmasse von 1,3 bis 2,0 Mio.

Chitosan ist ebenfalls ein Polysaccharid biologischen  
Ursprungs und entsteht durch Deacetylierung von Chitin, einem  
 $\beta$ -1,4-glycosidisch verknüpften Biopolymeren aus Acetyl-  
20 Glucosamin-Einheiten. Chitin stellt die typische  
Gerüstsubstanz der höheren Pilze (Ständerpilze) und  
Arthropoden dar.

Anwendungsbereiche für Kombinationen aus Cellulose und  
25 Chitosan sind aus dem Stand der Technik bestens bekannt. So  
können bspw. Mischungen aus Chitosan und Cellulose mit Hilfe  
transformierter Pflanzenzellen erhalten werden (WO 00/09729);  
allerdings stehen im Zusammenhang von Kombinationen aus  
Cellulose und Chitosan kosmetische Formulierungen, die  
30 Wundversorgung und hier insbesondere spezielle Formen von  
künstlicher Haut im Vordergrund.

So sind aus der Literatur Wundabdeckungen bekannt, die  
Chitosan-Derivate, wie z. B. Succinyl-Chitosan enthalten  
35 (JP 08196613) oder eine Kombination aus Heparin als  
Polysaccharid-Komponente und Chitosan (WO 96/02 260).

Als künstliche Haut werden laut K. Matsuka et al. [Nesslo, Vol. 18, Nr. 2., 1992, Seiten 79-82] nicht verwobene, synthetische Fasern eingesetzt, die eine mit Chitosan gecoatete Cellulose enthalten. In dem japanischen Dokument  
5 JP 0390011 ist ein Kosmetikum für die Hautmassage beschrieben, mit einem Anteil an Chitosan-enthaltender Cellulose. Eine Mischung aus Chitosan und polysaccharidischen Fasern wird gemäß JP 0315475 als Bandage zum Schutz von Wunden eingesetzt.

10 Neben diesen Mischungen sind auch reine Cellulosezubereitungen als Hautersatz oder Hautabdeckung bekannt: So wird gemäß J. D. Fontana et al. [Appl. Biochem. Biotechnol., Vol 24-25, 1990, Seiten 253-264] eine von  
15 Acetobacter stammende Cellulosehaut als temporärer Hautersatz verwendet. Gemäß WO 86/02 095 wird ebenfalls Acetobacter herangezogen, um Cellulose zu produzieren, die als künstliche Haut oder als Lederersatz verwendet wird.

20 Acetobacter wird gemäß Carbohydrates Polymers 32(1997), S. 223-227 zur Herstellung eines Polysaccharids mit einem N-Acetylglucosamin-Rest in Gegenwart von D-Glucose und Phosphorylchitin verwendet.

25 Aber auch bioabbaubare Filme sind bekannt, die bspw. gemäß RU 2 108 114 aus dem Protein Collagen bestehen, das mit Glutaraldehyd quervernetzt wurde und das Chitosan enthält. Schließlich beschreiben C. H. Su et al. in Biomaterials 18(17), 1997, Seiten 1169-74 ein Pilzmycel als Quelle für  
30 Chitin, das mit dem Polysaccharid  $\beta$ -1,3-Glucan als Wundabdeckung eingesetzt wird.

Im Bereich der Wundbehandlung gibt es somit eine breite Palette an Produkten biologischen Ursprungs, die neben den  
35 herkömmlichen Methoden zur Wundbehandlung, wie etwa Mull, Verband und Pflaster, vor allem für die Behandlung großflächiger Verletzungen eingesetzt werden.

So sind z. B. Filme aus mikrobiell produzierter Cellulose der Firmen BioFill, Brasilien (US 4,912,049), Johnson & Johnson, USA (US 4,588,400 und US 4,863,565) und Weyerhaeuser, USA (US 4,863,565), bekannt. Die Filme werden dabei entweder  
5 direkt von den Bakterien (z. B. *Acetobacter xylinum*) produziert oder es wird aus der im Rührkesselreaktor produzierten Cellulose durch chemische Behandlung ein Cellulosefilm hergestellt.

10

Mit Hilfe der Gentechnologie veränderte Mikroorganismen spielen in diesem Zusammenhang allerdings noch keine oder eine nur untergeordnete Rolle. Der WO 97/16540 kann bspw. allenfalls die Expression des Chitinsynthase-1-Gens (CHS1)  
15 entnommen werden, das allerdings nicht für die Herstellung eines Wundfilmes eingesetzt wird sondern für das Zellwachstum.

Andere der eben genannten Produkte zur Wundbehandlung sorgen  
20 für eine verbesserte Wundheilung, indem sie heilfördernde Substanzen wie etwa Chitosan enthalten. So werden z. B. Wundauflagen aus Collagen/Chitosan-Mischungen verwendet (US 5,116,824 sowie US 5,166,187) oder es werden Filme aus anderen Materialien mit Chitosan beschichtet, z. B.  
25 Polyvinylpyrrolidon (JP 3151976).

Das Problem dabei ist allerdings das Chitosan, das erst durch Deacetylierung aus dem Chitin von Schalentieren gewonnen wird. Bei dieser Art der Chitosanproduktion sind Vorkommen  
30 und Qualität saisonal unterschiedlich und provenienenzabhängig.

Großflächige Verletzungen der menschlichen Haut, z. B. verursacht durch Verbrennungen oder Abschürfungen stellen für die Medizin immer noch ein relativ großes Problem dar. Der  
35 Grund liegt darin, dass Patienten mit derartigen Verletzungen u. a. einen hohen Feuchtigkeitsverlust erleiden. Entscheidend ist dabei vor allem die Phase bis etwa 36 Stunden nach dem

Verletzungsereignis. Anschließend tritt dann ein  
gegenteiliger Effekt ein, d. h. die Wunde verschließt sich  
primär, die Gewebsflüssigkeit wird zurückgehalten und es  
kommt zu lokalen oder großflächigen Schwellungen, nicht  
5 selten begleitet von Spannungsschmerzen.

Die Behandlung derartiger Verletzungen beschränkt sich  
bislang hauptsächlich auf das wiederholte Auftragen diverser  
Wundsalben, das Bedecken der Wunde mit einem Mull und das  
10 Fixieren durch einen Verband. Zusätzlich werden dem  
Patienten, abhängig von der Größe der Verletzung, noch  
Antibiotika verabreicht.

Da derartige Wundauflagen die Wunde hermetisch abschließen,  
15 also keinen Gasaustausch zulassen und nicht transparent sind,  
ist ein häufiger Wechsel des Verbandes unvermeidbar, zumal  
diese Verbände auch nur eine begrenzte Aufnahmekapazität für  
Gewebsflüssigkeit (Blut, Lymphe) besitzen. Dies ist dem  
Heilungsprozess jedoch keineswegs dienlich, werden doch die  
20 neu gebildeten Hautflächen durch das Ablösen des Verbandes  
leicht beschädigt.

Abgesehen von den Schmerzen, die der Patient auch noch  
während der Heilung zu erdulden hat, spielt auch noch der  
25 psychische Aspekt eine Rolle. Selbst wenn die Wunden  
abheilen, bleiben bei der eben beschriebenen Therapie dennoch  
oft entstellende Narben zurück, die dem Patienten womöglich  
mehr Probleme bereiten als die Schmerzen.

30 Etwas Abhilfe können zwar Transplantationen schaffen, diese  
sind zum einen aber sehr zeit-, gedulds- und kostenintensiv,  
zum anderen wird die schon geschädigte Körperpartie erneut  
einem starken Stress ausgesetzt.

35 Eine Alternative zur Wundversorgung mit Wundsalbe, Mull und  
Pflaster ist die Transplantation unversehrter Haut auf die  
Wunde. Denkbar sind autogene und heterogene

Transplantationen, die Transplantation von Spenderhaut sowie die Verwendung von künstlicher Haut.

5 All diese Alternativen haben jedoch ihre Nachteile: Autogene Transplantationen verlagern zumeist lediglich die Verletzung, sind also nur bei Verbrennungen dritten Grades gerechtfertigt. Die Nachteile der anderen Methoden beginnen mit der begrenzten Haltbarkeit von maximal 2 Wochen, hinzu kommen noch z. B. ethische Bedenken und mentale Probleme bei  
10 der Verwendung der Haut Verstorbener.

Aus den geschilderten Nachteile des Standes der Technik hat sich deshalb für die vorliegende Erfindung die Aufgabe gestellt, einen mikrobiell erzeugten, physiologisch-  
15 verträglichen, permeablen Film, bestehend aus Chitosan-enthaltender Cellulose zu entwickeln, der elastisch und durchsichtig ist, einen Gasaustausch zulässt und der als Wundauflage verwendet werden kann.

20 Gelöst wurde diese Aufgabe durch einen Film, der mit Hilfe eines Cellulose- und Chitin-produzierenden Mikroorganismuses und durch Deacetylierung der Chitin-Anteile zum Chitosan hergestellt wurde.

25 Bei der praktischen Umsetzung dieser Aufgabenlösung haben sich überraschend viele Merkmale und Effekte als überaus positiv erwiesen.

Der Chitosan-enthaltende Cellulosefilm weist eine vernetzte  
30 Struktur auf, die seinen Einsatz als Wundauflage deshalb so interessant macht, da er in einigen Eigenschaften der Haut entspricht:

➤ Es ist ein Gasaustausch möglich, ein Flüssigkeitsverlust  
35 durch den Film tritt jedoch nicht auf; auch stellt der Film eine wirksame Barriere gegenüber Keimen dar.

- Weiterhin ist der Film elastisch und fühlt sich auf der Haut generell als sehr angenehm an.
- Der Film ist durchsichtig, ein oftmaliger  
5 Verbandswechsel ist somit unnötig, die damit verbundene Verletzung der heilenden Wunde und die Infektionsgefahr werden reduziert.

Daneben haben sich weitere Vorteile des erfindungsgemäßen  
10 Cellulosefilms ergeben:

- Geringe Kosten für Produktion und Aufbereitung, da der Film einfach zu sterilisieren ist. Auch die Aufbewahrung erfolgt bei normalen Umgebungsbedingungen, da der Film  
15 nicht verderblich ist.
- Der Film kann einfach auf die Wunde gelegt werden, eine Fixierung durch Pflaster und Verbände ist unnötig.
- 20 ➤ Der Film lässt sich aufgrund seiner Elastizität und Haftungsfähigkeit nahezu auf allen Körperstellen einsetzen.
- Die Anwendung des Cellulosefilms reduziert die Schmerzen unmittelbar, da er die freiliegenden Nervenenden schützt.  
25
- Die Narbenbildung wird reduziert.
- 30 ➤ Es treten keine allergischen Reaktionen auf.

Im Rahmen der Erfindung haben sich Filme als besonders geeignet erwiesen, die mindestens 0,1 Gew.-% Chitosan enthalten, wobei 0,1 bis 10 Gew.-% besonders zu bevorzugen  
35 sind. Die maximale mögliche Obergrenze für den Chitosan-Gehalt variiert im allgemeinen mit den jeweiligen speziellen Anwendungsbereichen und sonstigen Inhaltsstoffen des

Cellulose-Films, überschreitet jedoch in vielen Fällen kaum die 50 Gew.-%.

Wie bereits angedeutet, ist es für bestimmte Anwendungsfälle  
5 notwendig, dass der Film eine spezielle Permeabilität aufweist, weshalb durch die Erfindung ein Film bevorzugt wird, der gas- und/oder flüssigkeits- und/oder lichtdurchlässig ist.

10 Eine erfindungswesentliches Merkmal ist die Tatsache, dass der beanspruchte Film mit Hilfe eines Mikroorganismuses hergestellt wurde. Dafür haben sich rekombinante Bakterienzellen als besonders geeignet erwiesen, wobei  
15 rekombinante Acetobacter-Zellen, und hier besonders bevorzugt Zellen des Stammes Acetobacter xylinum, den Anforderungen insbesondere entsprechen.

Für den vorliegenden Fall ist es nun besonders vorteilhaft, wenn Bakterienzellen für die Produktion des erfindungsgemäßen  
20 Filmes eingesetzt wurden, in die ein für Chitin-Synthetase und/oder Chitin-Synthase codierendes Gen (Operon) transformiert worden ist, was die Erfindung ebenfalls berücksichtigt und was vorzugsweise durch Elektroporation geschehen sein sollte.

25 Alternativ besteht auch die Möglichkeit, dass die Genübertragung mit Hilfe eines Plasmids und/oder eines Vektors erfolgt ist. Bei dieser Variante sollte die Genübertragung vorzugsweise mit Hilfe einer bakteriellen  
30 Wirtzelle durchgeführt worden sein; Escherichia coli-Zellen, die ihrerseits rekombinant sein können, sind für die Genübertragung besonders gut geeignet.

Hinsichtlich der Genübertragung über einen Vektor sieht die  
35 Erfindung vor, dass dies vorzugsweise mit einem Bakterienkompatiblen Vektor, wie z. B. pUC19 erfolgt ist.



Wie ebenfalls bereits beschrieben, stellt Chitin die hauptsächliche Stützsubstanz bei Pilzen dar, weshalb Pilze zur Chitinproduktion bevorzugt sind. Aus diesem Grund greift auch die vorliegende Erfindung zur Produktion von Chitin auf  
5 Gene zurück, die aus der DNA oder auch aus einer reverstranskribierten cDNA eines Hefepilzes stammen, wofür die bekannten Hefepilze *Aspergillus nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Neurospora crassa* in vorteilhafter Weise geeignet sind.

10 Selbstverständlich können auch alle anderen geeigneten Mikroorganismen natürlichen Ursprungs oder mit Hilfe bio- oder gentechnologischer Verfahren veränderte Mikroorganismen zur Lieferung des Chitin-Synthetase-/Synthase-Gens  
15 herangezogen werden.

Die breitgefächerten Möglichkeiten, die sich mit dem erfindungsgemäßen Film ergeben, veranschaulicht nicht zuletzt eine weitere Erfindungsvariante, die den Einsatz von  
20 Cellulose- und Chitin-produzierenden Mikroorganismen vorsieht, die Enzyme zur Synthese von Biopolymeren enthalten, die mit Chitin strukturell verwandt sind, worunter insbesondere Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat und Heparin fallen. Aber auch andere physiologisch verträgliche und für  
25 den jeweiligen Anwendungsfall des erfindungsgemäßen Films geeignete Substanzen können von den im Wesentlichen den Film-produzierenden Mikroorganismen synthetisiert werden.

Um letztendlich zum gewünschten Produkt, dem Cellulose- und  
30 gleichzeitig Chitosan-enthaltenden Film zu gelangen, müssen die Chitin-Anteile durch Deacetylierung in Chitosan umgewandelt werden.

Schließlich kann der beanspruchte Film zur Abrundung seiner  
35 Einsatzmöglichkeiten neben den beiden wesentlichen Hauptkomponenten Cellulose und Chitosan noch zusätzlich andere Wirkstoffe oder Füllstoffe enthalten, wobei ein oder

mehrere Antiallergene, Antibiotika, Antioxidantien, Antischmerzmittel, Antiseptika, Entzündungshemmer, Immunstimulantien, Moisturizer, Radikalfänger, Strahlenblocker und dermatotrophe, neurotrophe und  
5 neoplastische Wirkstoffe vorzuziehen sind.

Als bevorzugte Verwendung des beanspruchten Films sieht die Erfindung seinen Einsatz als Wundauflage und/oder Hautersatz und/oder als künstliche Blutbahn vor, wobei der Film im  
10 letztgenannten Fall sowohl in seiner Gesamtheit natürliche Blutbahnen ersetzen kann, aber auch nur als äußere Beschichtung und/oder Innenauskleidung dienen kann; er kann aber gleichermaßen auch in allen anderen medizinischen und/oder nicht-medizinischen Bereichen verwendet werden, in  
15 denen seine speziellen Eigenschaften von Vorteil sind.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Behandlung von großflächigen Verletzungen, wie z.B. Verbrennungen oder Abschürfungen, durch Auflegen des  
20 erfindungsgemäßen Films auf die Verletzung.

Die nachfolgenden Beispiele veranschaulichen die vielfältigen Vorteile des erfindungsgemäßen Cellulose- und Chitosan-enthaltenden Filmes.

25

### Beispiele

#### 1. Kultivierung Acetobacter (Basiskultur)

30 Als Cellulose-produzierender Trägerorganismus für das Chitin-Synthetase-Gen wurde Acetobacter xylinum, ein aerobes gram-negatives Bakterium ausgewählt, das in der Lage ist, Glucose in Cellulose zu metabolisieren.

35 Die Kultivierung erfolgte unter statischen Bedingungen bei Temperaturen zwischen 25 und 30 °C.

Für die Celluloseproduktion erwies sich das von Schramm und Hestrin in Biochem. J. 1954, 58, Seite 345-352, beschriebene Medium am geeignetsten. Dieses Medium enthält pro Liter:

5	20 g	Glucose
	5 g	Pepton
	5 g	Hefeextrakt
	2,7 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,15 g	Zitronensäure
10	Rest	Wasser

Die Kultivierung erfolgte über eine Dauer von mehreren Tagen.

## 2. Isolierung der Chitin-Synthetase-Gene

15

Die Chitin-Synthetase-Gene wurden aus *Aspergillus nidulans* isoliert. Die Gene wurden nach einer reversen Transkription der RNA aus der cDNA isoliert.

## 3. Klonierung der Chitin-Synthetase-Gene in Acetobacter

Die Chitin-Synthetase-Gene wurden nach der unter 2. beschriebenen Isolierung in entsprechende Plasmide ligiert und zur Amplifikation in *Escherichia coli*-Zellen transformiert. Als Selektionsmarker diente Ampicillin. Nach Kultivierung positiver E.-coli-Klone wurde das Plasmid re-isoliert, die Chitin-Synthetase herausgeschnitten, in einen *Acetobacter*-spezifischen Vektor vom Typ pUC19 ligiert und in *Acetobacter*-Zellen der Basiskultur 1 transformiert.

Als Selektionsmarker in *Acetobacter* diente eine Ampicillin-Resistenz. Um Störungen durch die vom *Acetobacter xylinum* gebildete Cellulose bei der Transformation vorzubeugen, wurde den Kulturen eine Cellulase-Lösung in einer Endkonzentration von 1 Gew.-% zugegeben. Die Transformation erfolgte mittels

Elektroporation.

#### 4. Kultivierung der Klone

Die Kultivierung der Chitin-positiven Acetobacter-Klone erfolgte im oben beschriebenen Schramm-Hestrin-Medium, das mit 50 µg/ml Ampicillin supplementiert war. Die Kultivierungsbedingungen wurden darüber hinaus im Vergleich zu der Basiskultur nicht verändert.

#### 5. Ernte des Chitin-enthaltenden Cellulose-Films

10

Der nach Stufe 4. erhaltene Cellulose-Film wurde nach gängiger Methode gereinigt und durch Deacetylierung des Chitins in den Chitosan-enthaltenden Cellulose-Film überführt, der weiteren Aufarbeitungs- und

15

Sterilisationsschritten unterzogen wurde.

20

Auf diese Weise wurde ein mikrobiell erzeugter, physiologisch-verträglicher, permeabler und über längere Zeit stabiler sowie haltbarer Film, bestehend aus Chitosan-enthaltender Cellulose mit einer Dicke von ca. 1,2 mm erhalten, der in hervorragender Weise zur Abdeckung von noch frischen oder bereits abheilenden Hautverletzungen geeignet ist.

25

**Patentansprüche**

1. Physiologisch-verträglicher, permeabler Film, bestehend aus Chitosan-enthaltender Cellulose, dadurch gekennzeichnet, dass er mit Hilfe eines cellulose- und chitinproduzierenden Mikroorganismuses und durch Deacetylierung der Chitin-Anteile zum Chitosan hergestellt wurde.
2. Film nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass er mindestens 0,1 Gew.-% Chitosan enthält.
3. Film nach einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, dass er 0,1 bis 10 Gew.-% Chitosan enthält.
4. Film nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass er gas- und/oder flüssigkeits- und/oder lichtdurchlässig ist.
5. Film nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Mikroorganismus rekombinante Bakterienzellen, vorzugsweise rekombinante Acetobacterzellen und ganz besonders bevorzugt Zellen des Stammes Acetobacter xylinum, eingesetzt wurden.
6. Film nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass in die Bakterienzellen ein für Chitin-Synthetase und/oder Synthase codierendes Gen (Operon) transformiert worden ist, vorzugsweise durch Elektroporation.
7. Film nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Genübertragung mit Hilfe eines Plasmids und/oder Vectors erfolgt ist.
8. Film nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Genübertragung über ein Plasmid mit Hilfe einer

bakteriellen Wirtszelle, bevorzugt einer Escherichia coli-Zelle und ganz bevorzugt einer rekombinanten E. coli-Zelle durchgeführt worden ist.

- 5 9. Film nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass als Vector ein bakterienkompatibler Vector eingesetzt worden ist.
- 10 10. Film nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet das als Vektor pUC19 eingesetzt worden ist.
11. Film nach einem der Ansprüche 6 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Gen aus der DNA oder aus einer reverstranskribierten cDNA eines Hefepilzes stammt.
- 15 12. Film nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Gen aus einem Hefepilz der Reihe Aspergillus nidulans, Saccharomyces cerevisiae oder Neurospora crassa stammt.
- 20 13. Film nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass cellulose- und chitinproduzierende Mikroorganismen verwendet werden, die Enzyme zur Synthese von mit Chitin strukturell verwandten Biopolymeren, insbesondere von Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat und Heparin, enthalten.
- 25 14. Film nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass er zusätzlich ein oder mehrere Antiallergene, Antibiotika, Antioxidantien, Antischmerzmittel, Antiseptika, Entzündungshemmer, Immunstimulantien, Moisturizer, Radikalfänger, Strahlenblocker und dermatotrophe, neurotrophe und neoplastische Wirkstoffe enthält.
- 30
- 35

14

15. Verwendung des Films nach einem der Ansprüche 1 bis 14 als Wundauflage und/oder Hautersatz und/oder künstliche Blutbahn.

5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 01/13123

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12P19/04 C12R1/02 C08L1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P C12R C08L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GB 2 314 856 A (BRITISH TEXTILE & TECHNOLOGY GROUP) 14 January 1998 (1998-01-14) claims	1,15
A	<p>---</p> <p>DATABASE WPI Week 199133 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1991-242301 XP002196720 "Complexed cpd. of microorganism cellulose - comprises microorganism cellulose or their derivs. high polymer material" &amp; JP 03 157402 A (NAKANO SU-MISE KK), 5 July 1991 (1991-07-05) abstract</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	1,15

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 April 2002

Date of mailing of the international search report

08/05/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mazet, J-F



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 01/13123

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CIECHANSKA DANUTA ET AL.: "Modification of bacterial cellulose" FIBRES TEXT. EAST. EUR., vol. 6, no. 4, 1998, pages 61-65, XP008002385 abstract ---	1-4, 15
A	WO 99 61482 A (TRUSTEES OF TUFTS COLLEGE ET AL.) 2 December 1999 (1999-12-02) page 7, line 25 - line 31 claims ---	1-4
A	WO 00 09729 A (PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL INC.) 24 February 2000 (2000-02-24) cited in the application ---	
A	KITAGAWA RYOICHI ET AL.: "New application of cellulose and chitosan for biodegradable polymer materials" SHIKOKU KOGYO GIJUTSU KENKYUSHO HOKOKU, vol. 27, no. 1, 1995, pages 28-35, XP008002382 abstract ---	
A	KARNEZIS T. ET AL.: "The biosynthesis of .beta.-glycans" TRENDS IN GLYCOSCIENCE AND GLYCOTECHNOLOGY, vol. 12, no. 66, 2000, pages 211-227, XP008002383 abstract -----	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/13123

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2314856	A	14-01-1998	NONE	
JP 3157402	A	05-07-1991	JP 3007363 B2	07-02-2000
WO 9961482	A	02-12-1999	AU 4211099 A WO 9961482 A1	13-12-1999 02-12-1999
WO 0009729	A	24-02-2000	AU 5561099 A	06-03-2000